

# ヒト・サブスタンスKレセプターの遺伝子マッピング と巨大DNA解析

著者	山本 良嗣
号	2191
発行年	1990
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10097/20417">http://hdl.handle.net/10097/20417</a>

氏 名（本籍）	やまもと よしつぐ 山 本 良 嗣
学 位 の 種 類	医 学 博 士
学 位 記 番 号	医 第 2 1 9 1 号
学位授与年月日	平 成 2 年 2 月 28 日
学位授与の要件	学位規則第5条第2項該当
最 終 学 歴	昭 和 57 年 3 月 東北大学医学部医学科卒業
学 位 論 文 題 目	ヒト，サブスタンスKレセプターの遺伝子マッピングと巨大DNA解析
論文審査委員	（主 査） 教授 多 田 啓 也      教授 柴 原 茂 樹  教授 岡 本      宏

# 論文内容要旨

## 【 目 的 】

染色体異常や原因不明の知能障害、脳疾患において脳代謝、神経伝達物質やそのレセプターに関する研究が活発化している。これら神経化学物質の遺伝子座位とその領域を知ることが病態を考える上で重要な情報を提供することも期待できる。サブスタンス P、サブスタンス K、およびニューロメジン K は知覚神経機能や末梢血管の平滑筋の収縮と弛緩に関わり、哺乳類タキキニン系に属する。これらへのレセプターのうち、サブスタンス K レセプター（以下 SKR）のヒト染色体における遺伝子座位の推定を *in situ* hybridization により行い、また、ヒトリンパ球 DNA の SKR 領域の Not I 断片をパルスフィールドゲル電気泳動法にて解析した。

## 【 材料および方法 】

1) SKR ゲノム断片：京都大学中西研究室で供与された SKR の牛胃 cDNA (pSKR 56) の HincII 断片 (827bp) を用い、ヒトゲノム DNA (16B6) 断片、1,300 bp を精製した。この 16B6 クローン DNA を遺伝子マッピングと巨大 DNA 解析に用いた。

2) 染色体標本：BrdU で同調培養した正常成人男性リンパ球を低調処理後、カルノア固定、火炎展開と急速冷却法でスライドガラス上に展開した。

3) 巨大 DNA 試料：正常成人男性リンパ球を分離し、アガロースゲルブロックに封入し、ブロックの外からプロティナーゼ処理を行ない、ブロック内に細胞をとじこめたまま巨大 DNA を調製した。

4) 高精度 *in situ* hybridization の方法：Zabel et al および Nakai et al の方法に従った。この方法を用いることにより、高精度の G 分染が可能で、より細かなマッピングが可能となる。

5) 巨大 DNA 解析方法：酵母標準マーカーと Not I による制限酵素処理を行った巨大 DNA 試料を 1% アガロースゲルプレートの sample well に包埋、封入し、Contour clamped homogeneous electric field gel electrophoresis (以下 CHEF) で電気泳動した。酵母標準マーカーで 260 kb から 1,500 kb までの DNA が一様に解析できる条件を検討し、pulse time 80 秒, voltage 165V (6V/cm), run time 20 時間で泳動を行った。泳動後、アガロースゲルプレートをエチジウムブロマイド染色し、トランスイルミネーター (254nm) で DNA の移動を確認しポラロイド写真を撮った (この間 11 秒)。その後アガロースプレートを 0.1 NHC1 で 15 分処理し、巨大 DNA を脱プリン化してより小さな断片としたのち、アルカリトランスファーを行ない、16B6 クローン DNA とのハイブリダイゼーションを行った。

## 【 結 果 】

### 1) in situ hybridization

観察した細胞数は490個。染色体上または染色分体に接する総計848のマイクロ・オートラジオグラフィーによる銀粒子の分布をみた。うち33個（総粒子数の3.9%）が1番染色体p34部位に、143個（16.9%）が1番染色体上にみられた。即ち、1番染色体上の銀粒子の23.1%が1p34に集中、SKR遺伝子の座位がこの部位にあると推定された。

### 2) 巨大DNAとしての解析

CHEF による泳動後、16 B 6 遺伝子断片とハイブリダイズするヒト染色体ゲノム Not I 断片は1.5 mbを越えるサイズであった。

## 【 考 察 】

近年、染色体の遺伝子レベルでの研究や、分子遺伝学的研究は急速に進展しつつあるが、真核生物の染色体が大体  $10^2 \sim 10^5$  kb の範囲であり、これまでの分子遺伝学で扱うDNAの大きさが20 kb 程度までである事を考えると両者の間には大きな開きがあった。パルスフィールドゲル電気泳動法は  $10^3$  kb 程度の巨大DNAを解析でき、両者の研究の間を埋めるものとして期待できる。

本報告は、SKR遺伝子のヒト染色体における遺伝子座位を1p 34に推定しえた最初のものである。SKRと同様に、他のタキキニンレセプターの遺伝子座位も、各々の遺伝子精製とともに決定されよう。また、1p 34部位に遺伝子座位を有する $\alpha$ -L-フコシダーゼ、アデニルキナーゼ2、ウロポルフィリノーゲン脱炭酸酵素など、近接遺伝子相互の位置も巨大DNAの解析を通して決定されていく可能性もある。酵母人工染色体を用いた巨大DNAクローニングの展開を含め今後の遺伝子研究の一方向を示すものと思われた。

## 審 査 結 果 の 要 旨

本研究にてヒト・サブスタンスKLレセプター (SKR) の遺伝子座位が1 p34部位にあり、そのNot I 断片は2メガベース以上のサイズであることが初めて明らかにされた。

近年遺伝子工学的手法を用い、ヒト染色体の構造、遺伝子情報の解析が盛んに行われている。一方、神経化学領域においても遺伝子工学の応用が行われ、神経化学物質やそのレセプターの構造や機能が明らかにされつつある。本研究の行われたサブスタンスKとは、サブスタンスP、ニューロメジンKとならび哺乳類タキキニンの一つとして知覚神経機能や末梢血管の平滑筋の収縮や弛緩に関わる。サブスタンスKVレセプター (SKR) とはこの神経伝達物質のレセプターである。

実験材料としてSKRの牛胃cDNA (pSKR56) のHinc- II 断片 (827bp) をもとに、ヒトλゲノムライブラリーから1.3kbのヒトSKR遺伝子断片 (16B6) を精製した。このDNA塩基配列と遺伝子領域の解析により、16B6が単一コピーであること、Zenopus Cocyteへの遺伝子導入と発言で電気生理学的に確認された牛SKRのcDNA (pSKR56) と高い一致性があり、16B6断片がまさしくヒトSKRの遺伝子の1断片であることが知られている。

本論文提出者はこの16B6断片を用い、SKR遺伝子がin situ hybridization法によってヒト1番染色体短腕p34領域に有意の銀粒子集中することを示し、世界に先駆けてこの遺伝子座位の推定に成功した。更に、ヒトリンパ球をゲルブロックに固定し、DNAに人為的な傷害を防ぎ、Not- I 制限酵素でDNAを切断、ゲルブロック内の巨大DNA断片のままパルスフィールド電気泳動とサザンブロッティングの条件を決めた。これらの結果SKR遺伝子がヒト染色体1 p34領域でNot- I 断片としておよそ2メガベース以上の大きさの中にあることを示した。

染色体1 p34領域にはこれまで $\alpha$ -L-フコシダーゼ、アデニルキナーゼ2、ウロポルフィリノーゲン脱炭酸酵素などの遺伝子座位が推定されている。これらの遺伝子との位置関係は今後明らかにされよう。かかる実験条件の設定と新知見は今後の染色体構成の研究にもつながり、医学博士の学位授与に価するものと判断できる。